

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В.М.Ёршик, А.И.Жебентяев

ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ АНТИАРИТМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТОДОМ ТСХ

Витебский государственный медицинский университет

В работе проведено сравнительное исследование различных вариантов тонкослойной хроматографии (ТСХ) лекарственных веществ антиаритмического действия. Изучено влияние молярной доли полярного органического растворителя и концентрации ион-парных реагентов на подвижность и селективность разделения антиаритмических лекарственных веществ. Разработана методика ТСХ – скрининга антиаритмических лекарственных веществ.

ВВЕДЕНИЕ

Тонкослойная хроматография является простым и доступным способом идентификации и оценки чистоты органических веществ. При разработке методик идентификации веществ основного характера методом нормальнофазовой ТСХ селективности разделения достигают, варьируя соотношение полярного и малополярного органического растворителя в бинарных смесях [1], либо путём проведения сравнительного исследования нескольких трёх – четырёхкомпонентных смесей [2], состав которых берётся из литературных данных. При анализе четвертичных и некоторых третичных аммониевых соединений использовались бинарные водно-органические подвижные фазы с прибавлением неорганических солей в качестве ион-парных реагентов [3, 4, 5]. В последние годы возрастает интерес к ион-парным и мицеллярным подвижным фазам с использованием поверхностно-активных веществ [6].

В литературе не удалось найти универсальных систем, позволяющих разделить и идентифицировать исследуемые антиаритмические лекарственные вещества.

Целью настоящей работы является изучение влияния различных факторов на подвижность лекарственных веществ антиаритмического действия (атенолол, метопролол, этмозин, верапамил, этализин, амиодарон), сравнение различных вариантов хроматографии и разработка методики ТСХ-скрининга исследуемых лекарственных веществ на наиболее распространённых и недорогих пластинах «сорбфил».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали образцы лекарственных веществ фармакопейной чистоты (таблица 1). Для хроматографирования применяли этанольные растворы концентрации 1 мг/мл. Разделение проводили на пластинках «Сорбфил» (Россия) с закреплённым слоем силикагеля СТХ-1А при температуре 291-293⁰К. Высота подъёма фронта подвижной фазы (ПФ) составляла 9 см. ПФ приготавливали путём смешивания соответствующих полярных органических растворителей с водой, хлороформом, солями, 25% аммиаком, диэтиламином, триэтиламином. Используемые в работе органические растворители (метанол, этанол, и-пропанол, ацетон, хлороформ) очищали по известным методикам. Вещества на пластины наносили дозированным капилляром по 1 мкл. Хроматографирование проводили в насыщенной камере (общий объём 0,45 л, объём подвижной фазы 10 мл). После высушивания пластины проявляли парами иода. Применение иода в качестве проявителя обеспечивает достаточно высокую чувствительность, не требует распыления токсических растворителей. В случае использования подвижных фаз, содержащих амины и аммиак, чувствительность реакции с иодом была невелика, поэтому хроматографические пластины проявляли реактивом Дра-

гендорфа, модифицированным по Мунье [7].

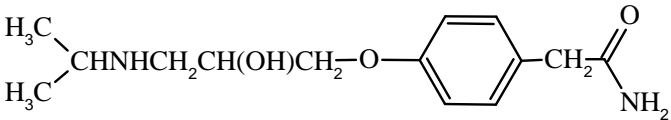
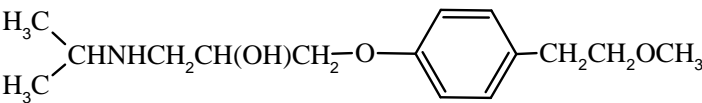
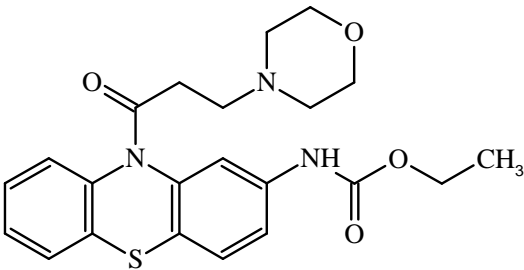
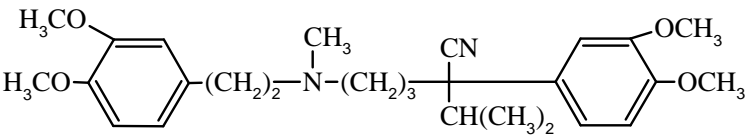
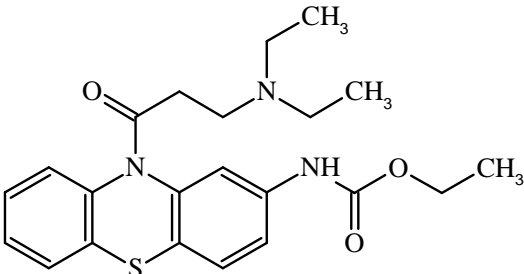
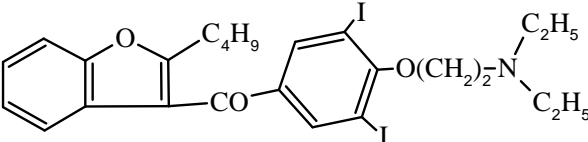
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние состава водно-органических фаз на подвижность лекарственных веществ

Исследовано влияние добавок апротонного растворителя ацетона и протонных растворителей этанола и изопропанола к водной фазе на подвижность лекарственных веществ. Результаты представлены на рис. 1.

Таблица 1

Изучаемые антиаритмические лекарственные вещества

Вещество	Структура	LgP
Атенолол [8]		0,026
Метопролол [8]		1,69
Этмозин [9]		2,98
Верапамил [9]		3,79
Этацизин		4,12 ¹
Амиодарон [10]		7,57

¹ Значение логарифма коэффициента распределения рассчитано с помощью программы ACDLabs методом инкрементов [13].

На кривых зависимости подвижности верапамила, этацизина, амиодарона от молярной доли органического модификатора (ОМ) можно выделить три участка. При увеличении молярной доли ОМ от 0 до 0,2-0,3 происходило резкое увеличение подвижности сорбатов. Такое поведение разделяемых веществ можно объяснить уменьшением диэлектрической проницаемости ПФ, а также наличием наряду с молекулярным механизмом удерживания разделяемых веществ, ионообменной составляющей адсорбции хроматографируемых веществ [3; 11]. Введение органического модификатора в подвижную фазу приводило к снижению степени диссоциации поверхностных силанольных групп и к уменьшению удерживания [12].

При увеличении молярной доли органического модификатора от 0,2-0,3 до 0,6-0,7 (в случае изопропанола до 0,4) увеличение подвижности исследуемых средств происходило в меньшей степени, чем на первом участке, что можно объяснить микрорасслоением бинарных водно-органических растворов [14; 15]. При этом происходило образование кластеров воды, окружённых молекулами органического неэлектролита. Гидрофобные участки исследуемых лекарственных веществ взаимодействовали с гидрофобными кластерами органических растворителей, а полярные группы взаимодействовали с полярной пограничной областью кластеров вода – органический растворитель.

При дальнейшем увеличении молярной доли ацетона в подвижной фазе выше 0,7-0,8 подвижность верапамила, этацизина, амиодарона снижалась. Данное явление можно объяснить разрушением кластерной структуры растворов и переходу к среде чистого органического растворителя. Это приводило к выталкиванию полярных группировок из среды органического растворителя и увеличению взаимодействия с поверхностью полярного силикагеля. Кроме того, поверхность силикагеля оказывала упорядочивающее действие на граничные слои воды [15], что, возможно, также обеспечивало улучшение взаимодействия с полярными группировками и

увеличение сорбции. В присутствии более полярного органического модификатора (этанол) в ПФ подвижность исследуемых веществ изменялась незначительно.

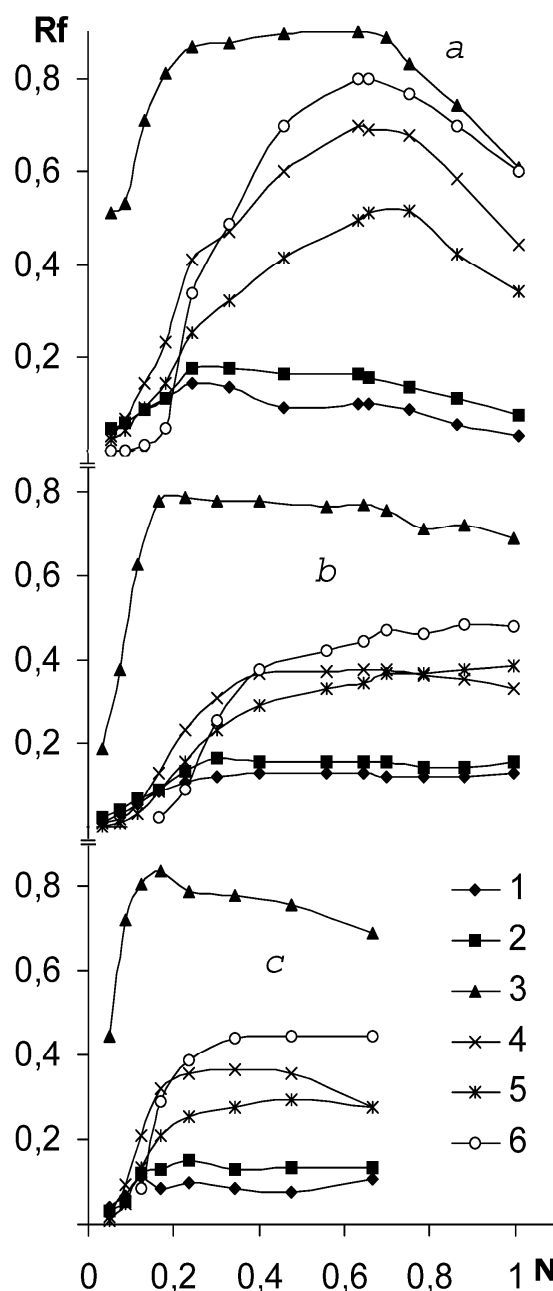


Рис. 1. Влияние молярной доли ацетона (а), этанола (б), изопропанола (с) в воде на подвижность антиаритмических лекарственных веществ. Пластины «Сорбфил»; 1. атенолол; 2. метопролол; 3. этмозин; 4. верапамил; 5. этацизин; 6. амиодарон.

Подвижность атенолола и метопролола в исследованных ПФ значительно ниже, чем соединений первой группы.

Кривые зависимости подвижности от молярной доли ОМ состояли из двух участков. При увеличении молярной доли ОМ от 0 до 0,2-0,4 подвижность сорбатов увеличилась, что обусловлено уменьшением заряда поверхностных силанольных групп [12]. При дальнейшем увеличении молярной доли ОМ подвижность сорбатов не изменялась или незначительно уменьшалась. Атенолол и метопролол, в отличие от соединений первой группы, обладали достаточно высокой полярностью (см. таблицу 1), поэтому при увеличении содержания органического растворителя в подвижной фазе начинали доминировать взаимодействия сорбент – сорбат и уменьшались взаимодействия сорбат – подвижная фаза.

Хроматографическое поведение этмозина в исследованных ПФ значительно отличалось от поведения верапамила, этацизина, амиодарона, атенолола и метопролола. Наличие атома кислорода в морфолиновом цикле этмозина приводило к уменьшению доступности третичного атома азота для взаимодействующих с ним силанольных групп. Поэтому подвижность этмозина во всех случаях больше.

Влияние добавок ионпарных реагентов

Исследовано влияние добавок ионпарных реагентов (натрия хлорид, натрия бромид, додецилсульфат натрия) к водно-ацетоновым фазам на подвижность исследуемых лекарственных веществ. Во всех случаях введение ионпарных реагентов приводило к увеличению подвижности и уменьшению селективности разделения. Для примера на рис. 2 представлено влияние добавок натрия хлорида на подвижность изучаемых веществ.

В водно-органических средах с содержанием ион-парных реагентов (рис. 3) при увеличении молярной доли ОМ подвижность сорбатов росла быстрее, чем в бинарных растворах вода-ОМ. Кривые зависимостей подвижности от молярной доли ОМ имели более правильную форму, что свидетельствует о лучшей воспроизводимости условий хроматографирования. Введение ионпарных реагентов приводит к улучшению симметричности пятен разделённых веществ, что актуально при ком-

пьютерном анализе изображений хроматограмм.

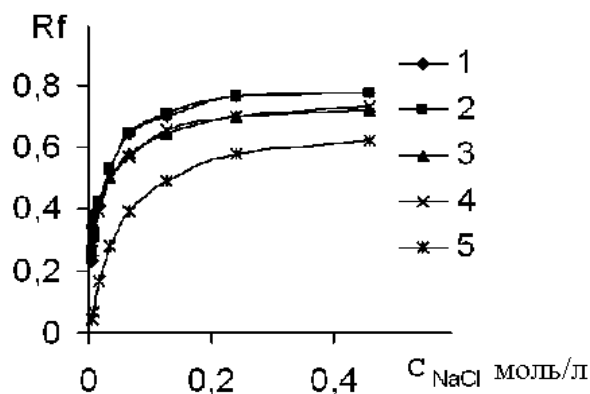


Рис. 2. Влияние добавок натрия хлорида на подвижность препаратов в системе вода-ацетон 1:1

Пластины «Сорбфил»; 1. атенолол; 2. метопролол; 3. верапамил; 4. этацин; 5. амиодарон.

Влияние добавок полярного органического растворителя к хлороформу на подвижность лекарственных веществ

Исследовано влияние добавок различных полярных органических растворителей к малополярному хлороформу на подвижность антиаритмических лекарственных веществ (рис. 4).

Полученные значения подвижностей исследуемых веществ были обработаны по уравнениям Снайдер-Сочевинского: $\lg k' = a + b \lg N$, и Скотта-Кучеры: $1/k' = c + dN$ где $k' = (1 - Rf)/Rf$, а, b, c и d – константы, характеризующие компоненты подвижной фазы, N – молярная доля более полярного компонента [16].

В случае добавок апротонного растворителя ацетона и протонодонорного растворителя этанола кривые удовлетворительно описывались с помощью указанных моделей, что свидетельствовало о доминировании вытеснительного механизма сорбции. Коэффициенты уравнений Снайдер-Сочевинского и Скотта-Кучеры представлены в таблице 2. Лишь при больших концентрациях полярного органического растворителя наблюдались отклонения от моделей удерживания.

При введении изопропанола в хлороформ данные уравнения не выполнялись

во всём диапазоне концентраций полярного растворителя. Всё это позволило предположить, что в области больших концентраций ацетона, этанола, а также при введении изопропанола наряду с вытеснительным механизмом сорбции значительный вклад вносила сольватация сорбатов органическим модификатором в подвижной фазе [17].

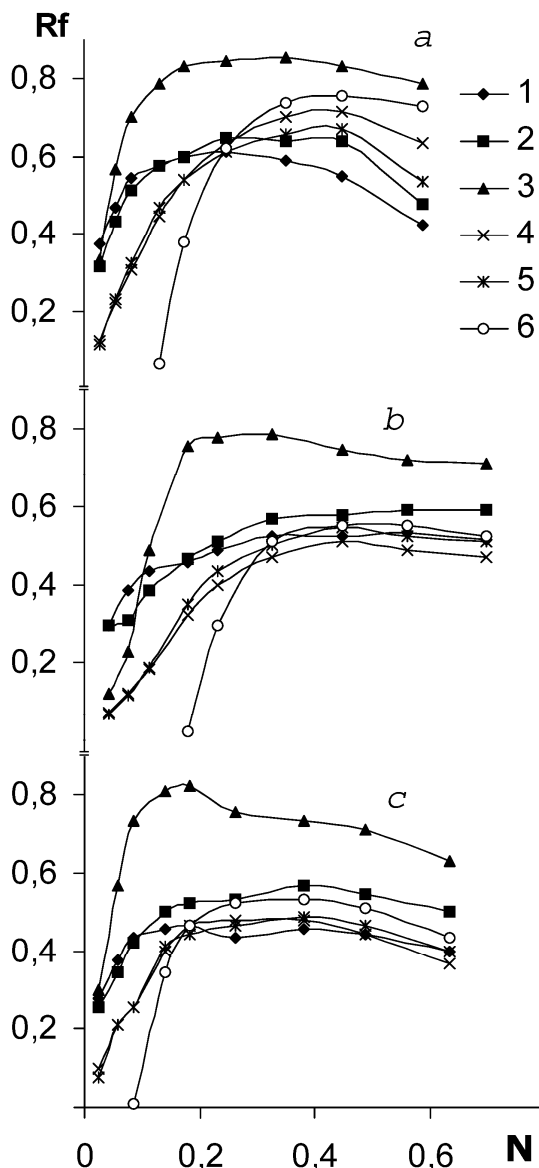


Рис. 3. Зависимость подвижности антиаритмических лекарственных веществ в присутствии натрия хлорида от молярной доли ацетона (а), этанола (б), изопропанола (с) в водной фазе.
Пластины «Сорбфил»; 0,05М NaCl 1. атенлол; 2. метопролол; 3. этмозин; 4. верапамил; 5. этацин; 6. амиодарон.

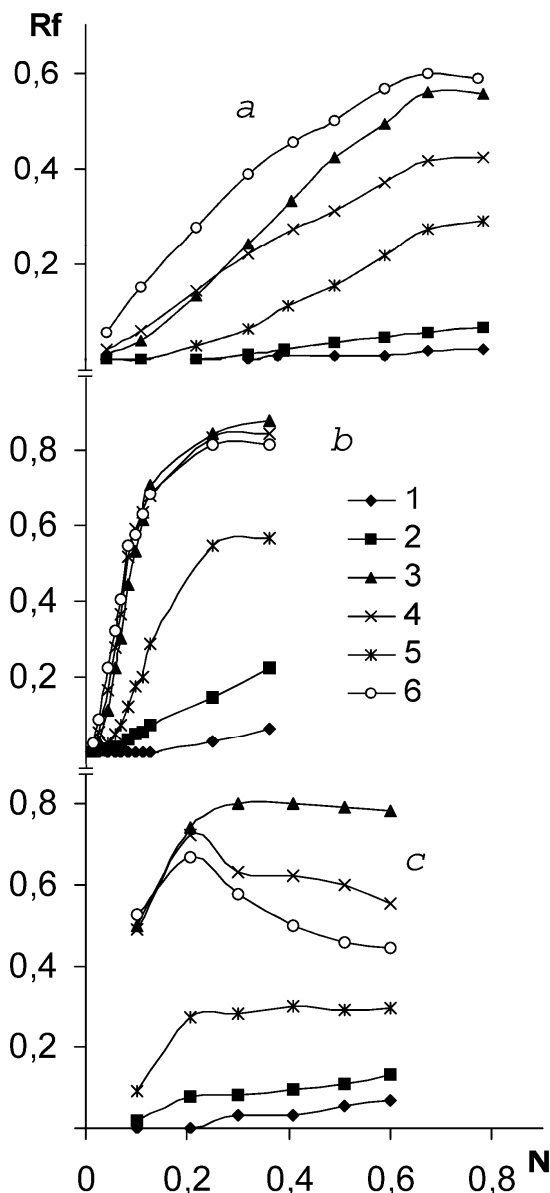


Рис. 4. Влияние молярной доли ацетона (а), этанола (б), изопропанола (с) в хлороформе на подвижность антиаритмических лекарственных веществ.

Пластины «Сорбфил»; 1. атенлол; 2. метопролол; 3. этмозин; 4. верапамил; 5. этацин; 6. амиодарон.

Введение аминов (аммиака, диэтиламина, триэтиламина) в систему приводило к резкому увеличению подвижности высокогидрофобных сорбатов (этмозин, этацин, амиодарон, верапамил), в результате они перемещались с фронтом подвижной фазы. Подвижность полярных атенлола и метопролола увеличивались в меньшей степени.

Селективность разделения

Введение добавок ионпарных реагентов в подвижную фазу приводило к нивелированию индивидуальных свойств сорбатов, что приводило к ухудшению селективности разделения. Введение аминов в органические подвижные фазы приводило к ухудшению селективности неполярных сорбатов (этмозин, этацизин, верапамил, амиодарон) и к улучшению селективности разделения полярных атенолола и метопролола. Наибольшей селективностью разделения среди исследованных подвижных фаз обладала фаза ацетон-вода 8:2. При этом происходило удовлетворительное разделение всех исследуемых веществ за исключением атенолола и метопролола. Подвижная фаза, содержащая ацетон и хлороформ в определённых соотношениях, также обладает хорошей селективностью, но при этом не удалось идентифицировать атенолол и метопролол, поскольку они оставались на линии старта. Подвижная фаза, содержащая хлороформ и изопропанол, не пригодна для разделения исследуемых антиаритмических лекарственных веществ, поскольку при этом образовывались размытые пятна. Кроме того, ввиду высокой вязкости изопропанола разделение длилось в течение нескольких часов.

Методика идентификации антиаритмических лекарственных веществ.

На линию старта пластины «Сорб-фил» наносят 1 мкг исследуемого вещества, параллельно наносят по 1 мкг атенолола, этмозина, этацизина, верапамила, амиодарона. Пластинку высушивают и помещают в насыщенную хроматографическую камеру объёмом 0,45 л. Объём подвижной фазы составляет 10 мл.

Приготовление подвижной фазы: в мерную колбу на 10 мл помещают 8 мл ацетона, доводят водой очищенной до метки, перемешивают и снова доводят водой до метки.

Хроматографирование проводят восходящим методом. Высота подъёма фронта ПФ составляет 9 см. После окончания хроматографирования пластинку высушивают в токе горячего воздуха и проявляют в камере, насыщенной парами иода.

В результате образуются зоны, характерные для каждого компонента смеси.

В случае обнаружения вещества с подвижностью, характерной для атенолола и метопролола, идентификацию проводят аналогично в системе хлороформ-этанол-25% раствор аммиака в соотношении 5:5:0,5. Проявление проводят методом погружения в реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье, после чего переносят на 10 минут в камеру, насыщенную парами иода.

Таблица 2

Коэффициенты уравнений Скотта-Кучеры и Снайдера-Сочевинского в системе хлороформ-полярный органический растворитель

Растворитель	Вещество	Модель Снайдера-Сочевинского				Модель Скотта-Кучеры			
		n	a	b	r ²	n	c	d	r ²
Ацетон	атенолол	2	—	—	—	2	—	—	—
	метопролол	6	-1,98	0,95	0,97	6	0,12	-0,03	0,99
	этмозин	9	-1,69	-0,30	0,99	7	2,07	-0,31	0,97
	верапамил	9	-1,22	0	0,99	8	1,02	-0,05	0,99
	этацизин	7	-2,15	0,15	0,99	7	0,68	-0,15	0,98
	амиодарон	9	-1,13	-0,32	0,99	8	2,16	-0,08	0,99
Этанол	атенолол	2	—	—	—	2	—	—	—
	метопролол	3	-1,24	0,01	0,99	3	0,88	-0,04	0,99
	этмозин	8	-2,78	-2,87	0,99	8	26,9	-1,31	0,99
	верапамил	9	-2,33	-2,47	0,99	8	23,81	-0,94	0,99
	этацизин	7	-2,69	-2,02	0,99	6	3,63	-0,15	0,97
	амиодарон	10	-1,86	-1,96	0,98	9	20,23	-0,57	0,99

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика идентификации антиаритмических лекарственных веществ, позволяющая идентифицировать атенолол, метопролол, этmozин, этализин, верапамил и амиодарон в одной хроматографической системе.

Использование варианта ион-парной хроматографии нецелесообразно, поскольку введение ион-парных реагентов приводит к ухудшению селективности разделения.

Наилучшая селективность разделения достигается при использовании в качестве подвижной фазы смеси ацетон – вода 8:2.

SUMMARY INVESTIGATION OF CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF ANTIARYTHMIC DRUGS BY TLC

Yorshyk V.M., Zhebentyaev A.I.

In this work a comparative investigation of different variants of thin-layer chromatography of antiarythmic drugs has been done. The mobility and selectivity of division of antiarythmic drugs from mole part of pole organic solvent and concentration of ion-pair reagents. Also the system of TLC screening of antiarythmic drugs has been worked out.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pang Z., Wang B., Gao L. Determination of amiodarone hydrochloride by fluorescent probe// Yaowu Fenxi Zazhi. – 1991. – Vol. 11, N. 6. – P. 344-346.
2. Tuszynska E., Kwiatkowska B., Wiczorkowska A., Kaniewska T. Investigation on chemical changes in overdue pharmaceuticals. Part I. Investigations on decomposition of atenolol// Chem. Anal. – 1994. – Vol. 39, N 5. – P. 563-569.
3. Бейкін С.П., Гапоненко Я.С. Ідентифікація β-адреноблокаторів та деяких інших ліків аналогічної дії// Фармацевтичний журнал. – 1987. – N. 6. – С. 63-65.

4. Жебентяев А.И., Дробышевский А.М., Алексеев Н.А. Биологически активные органические основания в ион-парной тонкослойной хроматографии// Журн. физической химии. – 2002. – Т. 76, № 9. – С. 1647-1653.
5. Giebelmann R. Ionenpaaradsorptionsdünnschichtchromatografie quartärer Ammoniumionen// Die Pharmazie. – 1981. – Vol. 36, N. 5. – P. 385-386.
6. Giebelmann R. Ionenpaaradsorptionsdünnschichtchromatografie quartärer Ammoniumionen// Die Pharmazie. – 1981. – Vol. 36, N. 7. – P. 514.
7. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Поверхностно-активные вещества в тонкослойной хроматографии// Журн. аналитической химии. – 2003. – Т. 58, № 8. – С. 808-818.
8. Шаршунова М., Шварц Б., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии, Ч. 2. – Москва: Мир, 1980. – 620 с.
9. Detroyer A., Vander Heyden Y., Carda-Broch S. et all. Quantitative structure-retention and retention-activity relationships of β-blocking agents by micellar liquid chromatography// J. Chromatogr. A. 2001. Vol. 912. P. 211-221.
10. Interactive PhysProp Database Demo// Environmental Science [Electronic resource]. – 1999 – 2004. – Mode of access: <http://esc.syrres.com>. – Date of access: 04.01.2003.
11. Moffat A.C. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals. Second Edition. London: The pharmaceutical press, 1986.
12. Nawrocki J. The silanol group and its role in liquid chromatography// J. Chromatography A. – 1997. – Vol. 779. – P. 29-71.
13. Жуков А.Н., Дмитриева И.Б., Харламов А.А. Влияние состава водно-этанольных растворов бромида натрия на плотность поверхностного заряда кремнезёма// Колл. журн. – 2000. – Т. 62, № 3. – С. 352-356.
14. Ertl P., Rohde B., Selzer P. Fast calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-based contributions and its Application to the prediction of

- drug transport properties// J. Med. Chem. – 2000. – Vol. 43. – P. 3714-3717.
15. Старобинец Г.Л., Рахманько Е.М., Мечковский С.А., Борщевская Т.И. Влияние структуры бинарных растворов вода-этанол на молекулярную сорбцию галогенидов калия сульфополистирольным катионитом// Журн. физической химии. – 2001. – Т. 75, № 12. – С. 2222-2225.
16. Казакова О.А., Гунько В.М., Воронин Е.Ф., Сильченко С.С., Чуйко А.А. Взаимодействие белков с поверхностью дисперсного кремнезёма в водных суспензиях// Колл. журн. – 1988. – Т. 60, № 5. – С. 613-617.
17. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. – М., 1999. – 348 с.
18. Ланин С.Н., Ланина Н.А., Никитин Ю.С. Влияние ассоциации молекул сорбата и модификатора в подвижной фазе на удерживание в высокоэффективной жидкостной хроматографии// Журн. физической химии. – 1995. – Т. 69, № 11. – С. 2045-2051.

Поступила 05.05.2006 г.

**.В. Василенко, В.И. Никулин, Т.И. Пискун,
В.А. Седакова, Е.В. Седаков**

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ, ОСАЖДАЕМОГО СПИРТОМ, ПЕКТИНА В СУШЕНЫХ ЯБЛОЧНЫХ ВЫЖИМКАХ

Учреждение образования
«Могилевский государственный
университет продовольствия»

Количественное определение пектина, осаждаемого спиртом в выжимках яблочных сушеных.

Цель исследования – разработка методики определения спиртоосаждаемого пектина в сушеных яблочных выжимках с сокращенной продолжительностью. В ходе исследования получены данные по

определению пектина, осаждаемого спиртом, в сушеных выжимках яблок с помощью известной методики и разработанной в рамках проведенных исследований. Проведен сравнительный анализ метрологических характеристик выбранных методик определения пектина.

ВВЕДЕНИЕ

Для количественного определения содержания пектина в растительных объектах существует достаточно много методик [1,2]. Большинство из них имеют недостатки: длительность определения, необходимость в специальном дорогостоящем оборудовании, низкую точность и надежность.

Цель настоящей работы – усовершенствовать методику определения массовой доли пектина, осаждаемого спиртом, в сушеных яблочных выжимках позволяющей, сократить продолжительность определения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись сушеные выжимки яблок урожая 2004 г. с содержанием пектиновых веществ, определенных карбазольным методом [3], – 22,62%, которые приняли за исходное содержание пектина в выжимках яблочных сушеных.

Содержание пектина, осаждаемого спиртом, определяли с помощью методики, предлагаемой в действующем в РФ ТУ 10.963.27-91 [4], и разработанной на кафедре «Технология продукции общественного питания и мясопродуктов» УО «МГУП».

1. В основе методики определения спиртоосаждаемого пектина [4] лежит принцип перевода протопектина выжимок в растворимое состояние с помощью кислотного – термического гидролиза и учета его содержания в гидролизате гравиметрическим методом.